

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-157361

(43) 公開日 平成8年(1996)6月18日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/35	ABE			
	AED			
// C 0 7 D 311/22				

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平6-304873	(71) 出願人	000003698 富山化学工業株式会社 東京都新宿区西新宿3丁目2番5号
(22) 出願日	平成6年(1994)12月8日	(72) 発明者	川▲崎▼ 博樹 富山県滑川市常光寺643
特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年6月10日、 日本炎症学会発行の「第15回日本炎症学会プログラム予 稿集」に発表		(72) 発明者	田中 啓一 富山県富山市下新北町1-31
		(74) 代理人	弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 シクロオキシゲナーゼ-2 選択的阻害剤及びシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤

(57) 【要約】

【構成】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを含有するシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤及びシクロオキシゲナーゼ-2発現抑制剤。

【効果】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンは、COX-2を選択的に阻害しCOX-2の発現誘導に対して抑制作用を示す一方、生体のホメオスタシスに重要な役割を演じているCOX-1にはほとんど影響せず、炎症部位選択的なPGE<sub>2</sub>産生を抑制し、例えば、消化管や腎において高い忍容性を有する薬剤として有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを含有するシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤。

【請求項2】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを含有するシクロオキシゲナーゼ-2発現抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを含有するシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤及びシクロオキシゲナーゼ-2発現抑制剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンは、既知化合物であり、抗炎症作用を有するにもかかわらず、消化管に対して高い忍容性を有することが知られている〔アルツナイミテル・フォッシュング・ドラッグ・リサーチ (Arzneim.-Forsch./Drug Res.), 第42(II)巻, 第7号, 第935-944頁〕。このことは、当該化合物が炎症部位選択的なプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生を抑制することに起因している〔アルツナイミテル・フォッシュング・ドラッグ・リサーチ (Arzneim.-Forsch./Drug Res.), 第42(II)巻, 第7号, 第945-950頁〕。しかしながら、当該作用の機序については、未だ知られていない。

【0003】 プロスタグランジン産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) は、ほとんどの組織に存在する構成酵素であるCOX-1と、様々な刺激により炎症部位の細胞に発現が誘導される誘導酵素であるCOX-2という薬理学的性質が異なる2種類のアイソザイムからなる。従って、COX-2を選択的に阻害する化合物は、胃粘膜障害や腎機能に関係する副作用が軽減され、安全域の高い抗炎症鎮痛剤などとしての可能性が高いことが報告されている〔アメリカン・ジャーナル・オブ・メディシン (American Journal of Medicine), 第95巻, 第2A40S~44S頁 (1993年)]。さらに、COX-2の遺伝子発現を選択的に抑制する化合物は、前記の副作用が軽減されると同時に、既存のCOX阻害剤にみられないステロイド様の機序を有する抗炎症剤などとしての可能性が高いことも報告されている〔プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 第91巻, 第3228~3232頁 (1994年)]。しかしながら、3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンがCOX-2選択的阻害作用又はCOX-2発現抑制作用を有することは、未だ知られていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 近年、安全域の高い抗炎症鎮痛剤などになる可能性が高いことから、COX-2を選択的に阻害し、又はCOX-2の発現を選択的に抑制する医薬の開発が望まれている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 このような状況下において、本発明者らは鋭意研究を行った結果、3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンが上記目的を達成し得るものであることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 本発明に用いられる3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンは、例えば、特開平2-49778号公報に開示された方法に従って製造することができる。

【0007】 本発明のCOX-2選択的阻害剤又はCOX-2発現抑制剤を医薬として用いる場合、通常知られている方法に従って、通常製剤化に使用される賦形剤、担体、希釈剤等の製剤補助剤を適宜混合して製剤化することができる。その剤型としては、経口製剤及び非経口製剤のいずれでもよく、例えば錠剤、カプセル剤、散剤、シロップ、顆粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、粉体制剤、坐剤、軟膏剤、注射剤等の形態とすることができる。また、投与方法、投与量及び投与回数、患者の年齢、体重及び症状に応じて適宜選択することができ、通常成人に対しては、1日当たり約0.05~1000mg/kg程度を1回又は数回に分割して経口投与又は非経口投与（例えば注射、点滴又は直腸部位への投与など）すればよい。

【0008】 次に、本発明における化合物の薬理作用を説明する。3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを被験物として用い、以下の試験を行った。

## 【0009】 試験例1

COX-1としてヒツジ精囊腺ミクロソーム (エドマンテクノロジー社製)、COX-2としてヒツジ胎盤由来COX-2精製品 (カイマンケミカル社製) を使用し、これらによるアラキドン酸からPGE<sub>2</sub>への転換率を酵素活性とした。COX-1活性測定の方法は、プロカシーニ (Procaccini) らの方法〔バイオケミカル・ファーマコロジー (Biochem. Pharmacol.), 第26巻, 第1051~1057頁 (1977年)] に準じた。すなわち、最終濃度100 µg/mlのヒツジ精囊腺ミクロソーム、5 mMエピネフリン及び5 mMグルタチオンを含む50 mMトリス緩衝液 (pH8.0) 0.5 mlに、ジメチルスルホキシドに溶解させた3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを加えた後、37℃で2分間前処置を行った。次いで、0.04 µCiの[1-<sup>14</sup>C]アラキドン酸を含むアラキドン酸10 nmolを添加し (最終濃度20 µM)、37℃で4分間反応させた。COX-2活性測定の方法は、ミチエル (Mitchell) らの方法〔プロシーディングス・オブ・ナショナル・ア

3

カデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 第90巻, 第11693~11697頁 (1993年) ] に準じた。すなわち、最終濃度 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のヒツジ胎盤由来 COX-2 精製品、5 mM エピネフリン、5 mM グルタチオン及び 1  $\mu\text{M}$  ヘマチンを含む 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml に、3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを加えた後、37℃ で 2 分間前処置を行った。次いで、0.04  $\mu\text{Ci}$  の [1-<sup>14</sup>C] アラキドン酸 (アマシャム社製) を含む アラキドン酸 3.3 nmol を添加し (最終濃度 6.6  $\mu\text{M}$ )、37℃ で 4 分間反応させた。COX 活性の測定は、柳と小松の方法 [パイオケミカル・ファーマコロジー (Biochem. Pharmacol.), 第25巻, 第937-941頁 (1976年) ] に準じて行った。すなわち、反応液に n-ヘキサン/酢酸エチル (2:1) を 2 ml 加え、反応を停止させ、遠心分離によりアラキドン酸を有機層に抽出した。同様の抽出操作を 2 回繰り返した後、水層に 1 ml のエタノールを加えて攪拌した後、遠心によって得られた上清全量を液体シンチレーションカウンター用バイアルに移し、PGE<sub>2</sub> 分画とした。回収した有機層をアラキドン酸分画とし、その 1 ml を液体シンチレーションカウンター用バイアルに分取した。それぞれの分画の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、全放射活性のうち PGE<sub>2</sub> 分画の放射活性の割合を算出し、これを PGE<sub>2</sub> 転換率とした。最終濃度 1% のジメチルスルホキシドのみを含むコントロールに対する 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンによる変換率の低下を、COX 活性抑制率で表した。その結果を図 1 に示す。

#### 【0010】試験例 2

マウス 3T3 線維芽細胞 (ATCC, CCL-163) を、10% 牛胎児血清 (ギブコ BRL 社製) を含む DMEM 培地 10 ml に  $6 \times 10^6$  個浮遊させ、90 mm ディッシュに播種した。一晚培養 (5% 酸素 + 95% 空気, 37℃) した後、細胞を洗浄し、無血清 MEM 培地に置換し、さらにジメチルスルホキシドの最終濃度が 0.1% になるように 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを添加し、15 分間前処理を行った。さらに、最終濃度が 1  $\mu\text{M}$  になるようにブラジキニン (ペプチド研究所製) を添加し、30 分間培養 (5% 酸素 + 95% 空気, 37℃) した。ブラジキニン処理した線維芽細胞から、コムジンスキーとサッチ (Chomczynski and Sacchi) らの方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 第162巻, 第156~159頁 (1987年) ] に準じ、アイソジェン (ニッポンジーン社製) を用いて、全 RNA を抽出した。この全 RNA に対し、ミラン (Milan) らの方法 [ジャーナル・オブ・セルラー・フィジオロジー (J. Cell. Physiol.), 第149巻, 第173~183頁 (1991年) ] に準じ、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行った。RT-PCR に使用するプライマーの配列は、

4

以下の通りである。

#### 【0011】COX-1

5' プライマー: 5'-TGTTTCAGCTTCTGGCCCAACAGCT-3'

3' プライマー: 5'-AGCGCATCAACACGGACGCCTGTT-3'

#### COX-2

5' プライマー: 5'-TTCAAAAGAAGTGCTGAAAAGGT-3'

3' プライマー: 5'-GATCATCTCTACCTGAGTGCTTT-3'

#### $\beta$ -アクチン

5' プライマー: 5'-ACAACGGCTCCGGCATGTGCAA-3'

3' プライマー: 5'-GCTCAGGAGGACAAATGATCTTG-3'

【0012】なお、RT-PCR により増幅される COX-1、COX-2 及び  $\beta$ -アクチン cDNA の大きさは、それぞれ 304、304 及び 969 bp である。増幅する mRNA の 3' プライマーを 50 pmol 含む ジエチルピロカーボネート水溶液に、全 RNA を 1  $\mu\text{g}$  加え、全量 7.5  $\mu\text{l}$  にし、68℃、15 分間加熱後、10 分間氷冷した。これに、全量 20  $\mu\text{l}$  になるように 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.3)、40 mM 塩化カリウム、8 mM 塩化マグネシウム、5 mM ジチオスレイトール、0.5 mM dNTPs、4.5  $\mu\text{g}$  / 20  $\mu\text{l}$  牛血清アルブミン、4 units / 20  $\mu\text{l}$  ニワトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素 (ギブコ BRL 社製) 及び 20 units / 20  $\mu\text{l}$  RNasin (プロメガ社製) を加え、42℃、60 分間逆転写反応後、10 分間氷冷した。これに、100 mM トリス緩衝液 (pH 8.3)、500 mM 塩化カリウム、15 mM 塩化マグネシウム及び 0.1% ゼラチンからなる反応液 8  $\mu\text{l}$ 、並びに 1.25 mM dNTPs 8  $\mu\text{l}$  を加え、さらに、全量 100  $\mu\text{l}$  になるよう 2.5 units / 100  $\mu\text{l}$ 、TaqDNA 合成酵素 (宝酒造社製) 及び 50 pmol / 100  $\mu\text{l}$  の 5' プライマーを加えた。ミネラルオイルを重層し、94℃ で 1.5 分間前処理した後、94℃ で 1 分間の熱変性、55℃ で 2 分間のアニーリング、72℃ で 3 分間の DNA 伸長反応を 1 サイクルとし、PCR を行った。反応を 21 サイクル行った後、72℃ で 10 分間伸長反応を行った。反応液をクロロホルムで除蛋白した後、エタノール沈澱し、増幅された DNA を回収した。得られた DNA を トリス/ホウ酸/エチレンジアミン四酢酸緩衝液で作製した 5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、臭化エチジウム処理し、紫外線照射により視覚化した。その結果を図 2 に示す。

【0013】図 1 及び図 2 より、3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンは、COX-2 を選択的に阻害し、COX-2 の発現誘導に対して抑制作用を示すことが見出された。すなわち、これらの相乗効果により、3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンは、生体のホメオスタシスに重要な役割を演じている COX-1 にはほとんど影響せず、炎症部位選択的な PGE<sub>2</sub> 産生を抑制し、例えば、消化管や腎において高い忍容性を有する薬剤であることが見出された。

#### 【0014】

【実施例】以下に具体的実施例を挙げて更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

5

6

## 【0015】実施例1

\* 剤を調製した。

以下に示す成分を用いて常法により硬ゼラチンカプセル\*

【表1】

	(mg)
3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ -4H-1-ベンゾピラン-4-オン	50
乳糖	114.5
コーンスターチ	20
ヒドロキシプロピルセルロース	2
軽質無水ケイ酸	1.5
カルボキシメチルセルロースカルシウム	10
ステアリン酸マグネシウム	2
計	200

## 【0016】実施例2

※【表2】

以下に示す成分を用いて常法により錠剤を調製した。

※

	(mg)
3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ -4H-1-ベンゾピラン-4-オン	25
乳糖	49
微結晶セルロース	36
ヒドロキシプロピルセルロース	1
カルボキシメチルセルロースカルシウム	6.6
ステアリン酸マグネシウム	1.2
タルク	1.2
計	120

## 【0017】実施例3

★【表3】

以下に示す成分を用いて常法により錠剤を調製した。

★

	(mg)
3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ -4H-1-ベンゾピラン-4-オン	50
乳糖	74
微結晶セルロース	55
ヒドロキシプロピルセルロース	2
カルボキシメチルセルロースカルシウム	15
ステアリン酸マグネシウム	2
タルク	2
計	200

## 【0018】実施例4

☆【表4】

以下に示す成分を用いて常法により錠剤を調製した。

☆

	(mg)
3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ -4H-1-ベンゾピラン-4-オン	100
乳糖	49
微結晶セルロース	55
ヒドロキシプロピルセルロース	2
カルボキシメチルセルロースカルシウム	15
ステアリン酸マグネシウム	2
タルク	2
計	225

## 【0019】

アミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを含有

【発明の効果】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニル 50 するシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤及びシクロオ

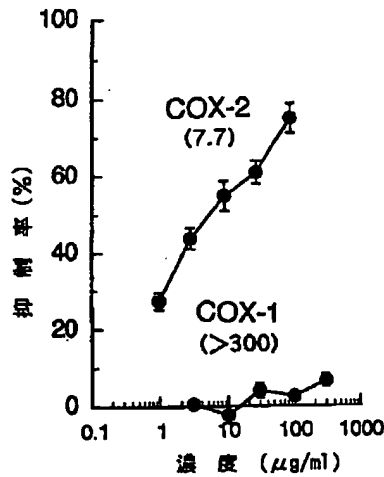
7

キシゲナーゼ-2発現抑制剤は、医薬品として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンの濃度とCOX活

【図1】



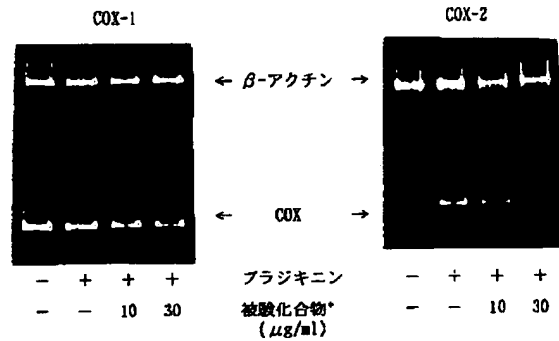
注) 括弧内の数字は50%抑制濃度(μg/ml)を示す。

8

性抑制率の関係を示す図である。

【図2】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンによるCOX mRNAの発現抑制を示すポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図2】



\* : 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

【手続補正書】

【提出日】平成7年3月16日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】 3-ホルミルアミノ-7-メチルスルホニルアミノ-6-フェノキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンによるCOX mRNAの発現抑制を示すポリアクリルアミドゲル電気泳動写真である。